

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-009665

(43)Date of publication of application : 14.01.1992

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
G01N 33/577

(21)Application number : 02-110536

(71)Applicant : TEIJIN LTD

(22)Date of filing : 27.04.1990

(72)Inventor : HOSODA KENJI
HONDA HITOMI
KUBOTA TAKAAKI
AKINO TOYOAKI
KUROKI YOSHIO
HINO SHUICHIRO

(54) METHOD FOR MEASURING LUNG DISEASE MARKER PROTEIN AND KIT FOR THIS METHOD

(57)Abstract:

PURPOSE: To make measurement in a short period of time by using an antihuman lung surfactant apoprotein monoclonal antibody.

CONSTITUTION: The monoclonal antibody for the lung surfactant apoprotein is immobilized to a suitable insoluble carrier. The insoluble carrier is then coated with a suitable material in order to avoid the nonspecific conjugation of the insoluble carrier and a measuring reagent or specimen sample. The insoluble carrier immobilized with the primary antibody obtained in such a manner, the specimen sample, the antilung surfactant apoprotein labeled with enzyme and nonionic, anionic surfactant are brought into contact into each other for a specified period of time at a specified temp. to effect reaction by simultaneously allowing the protein having 1.6 to 5.0 mol.wt. and 1.0 to 5.0 isoelectric point to coexist with an immune reaction liquid, for example, a buffer soln. for immune reaction. The insoluble carrier is then washed with a detergent and the quantity of the material labeled on the secondary antibody existing thereon is measured. The quantity of the lung surfactant apoprotein in the specimen sample is calculated from this value. The lung disease marker protein in the human blood is measured with a small amt. of the specimen with a high sensitivity in a short period of time.

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A) 平4-9665

⑫ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)1月14日

G 01 N 33/53
33/577

W 7906-2J
B 9015-2J

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全10頁)

⑭ 発明の名称 肺疾患マーカー蛋白の測定法およびそのためのキット

⑮ 特 願 平2-110536

⑯ 出 願 平2(1990)4月27日

⑰ 発 明 者 瀬 田 健 治 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社東京研究センター内

⑱ 発 明 者 本 田 仁 美 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社東京研究センター内

⑲ 発 明 者 堀 田 貴 明 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社東京研究センター内

⑳ 発 明 者 秋 野 豊 明 北海道札幌市西区西野一条4-4-1

㉑ 発 明 者 黒 木 由 夫 北海道札幌市豊平区平炭三条1-3-15

㉒ 出 願 人 帝 人 株 式 会 社 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号

㉓ 代 理 人 弁 理 士 前 田 純 博

最終頁に続く

図1 前田 純博

1. 発明の名称

肺疾患マーカー蛋白の測定法およびそのためのキット

2. 特許請求の範囲

(1) 抗ヒト肺サーファクタントA蛋白(SPA)モノクローナル抗体を用いることと血中に存在する肺疾患マーカーの測定方法。

(2) 該抗体が該SPAの異なるエпитープを認識する2つの抗体であって、反応系に①非イオンおよび陰イオン界面活性剤、②分子量1.6〜5.0万でかつ等電点が1.0〜5.0である蛋白を同時に存在させることを特徴とする請求項1記載の測定方法。

(3) 一方の抗体を担体に固定し、他方の抗体を標識化することを特徴とする請求項2記載の測定方法。

(4) 標識抗体が、西洋ワサビパーオキシダーゼで標識化されることを特徴とする請求項2記載の

測定方法。

(5) 該蛋白が、スキムミルクである請求項2記載の測定方法。

(6) 陰イオン界面活性剤がアルキルスルホン酸塩類である請求項2記載の測定方法。

(7) 非イオン界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルフェノールエーテル類である請求項2記載の測定方法。

(8) 陰イオン界面活性剤が、アルキルスルホン酸塩類で、非イオン界面活性剤がポリオキシエチレンアルキルフェノールエーテル類である請求項2記載の測定方法。

(9) 肺疾患が間質性肺炎、肺炎、肺線癌、又は肺扁平上皮癌である請求項1記載の測定方法。

(10) ヒト肺サーファクタントA蛋白の異なるエпитープを認識する2つの抗体試薬、非イオンおよび陰イオン界面活性剤、および分子量1.6〜5.0万で等電点が1.0〜5.0である蛋白を含む免疫反応用緩衝液からなることを特徴とする人血中に存在する肺疾患マーカー蛋白の測定用

キット。

3. 発明の詳細な説明

(4) 産業上の利用分野

本発明は人血中の肺疾患マーカー蛋白の測定法に関する。さらに詳しくは、本発明はヒト肺サーファクタントアポ蛋白 (SP-A) の異なるエпитオプを認識する2つの抗体を用い、反応系に特定の界面活性剤と蛋白を同時に存在させることを特徴とする人血中の肺疾患マーカー蛋白の測定法に関する。

(a) 従来の技術及び発明が解決しようとする課題

動物の肺胞には、肺表面活性物質と称するリン脂質を主成分とする生理活性物質が存在する。これは肺胞の内腔を覆い、肺胞上皮保護作用を有すると共に、動物が呼吸機能を維持する上に重要な生理的機能を有している。即ち、肺表面活性物質は、呼吸時、呼気時における肺胞内面の表面張力を変化させるといった特異な表面活性を有しており、肺胞相互間の安定性に寄与して、抗無気肺作用を示すとされている。かかる肺表面活性物質

が不足すると肺胞は虚脱し、安定した換気能力を維持できなくなり例えば、新生児呼吸窮乏症候群 (IRDS) や、成人呼吸窮乏症候群 (ARDS) のごとき症状が表われる。

従来、羊水中の肺表面活性物質の量を測定または推定する方法としては、いくつかの方法が提案されている。例えば、肺表面活性物質のマーカーとして、羊水中のL/S比 (レシチンとスフィンゴミエリンの比) や羊水中のジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) 量が測定されているが、前者の方法は、肺表面活性物質の主成分であるリン脂質を測定するのではなく、IRDSとの相関性が低いという欠点があり、後者の方法では、感度が悪いという問題点がある。ところで、肺表面活性物質の約90%はリン脂質や中性脂質等の脂質であるが、約10%は蛋白であり、これらは脂質と蛋白の複合体、即ちリポ蛋白として存在している。肺表面活性物質から脂質を除去すると水不溶性の蛋白が得られ、これをアポ蛋白 (SP-A) と呼んでいるが、分子量約36,000 (36K) の

糖蛋白が主成分である。リン脂質に比べ、アポ蛋白は特異性に優れた高感度に検出し得るので、肺表面活性物質のマーカーとしてアポ蛋白を用いることも検討され、いわゆるポリクローナル抗体による免疫学的定量も行なわれてきた。しかしながら、ポリクローナル抗体を用いる方法は、測定に長時間を要した感度も十分ではないという問題点があった。そこで、本発明者らは、肺表面活性物質を構成するアポ蛋白に対するモノクローナル抗体を作成し、これを用いて測定する方法を既に提案 (特開昭62-64956号および特願昭62-216355号) した。上記方法は、実用のために充分耐えうる方法であり、肺洗浄液、羊水および喀痰中のアポ蛋白の測定に応用されている。

しかしながら、検体として肺洗浄液、羊水等を入手することは患者に非常な負担を伴う。また従来の方法では血中のアポ蛋白の測定については言及していない。

一方、肺疾患には間質性肺炎、サルコイドーシス、肺炎、肺結核あるいは肺線癌、肺扁平上皮癌

等の種々の肺疾患が知られているが、ヒトの血中に存在すると予想されるこれらの肺疾患マーカー蛋白を測定してその診断、治療に用いることは、従来知られていない。

(A) 課題を解決するための手段

本発明者らは、特開昭62-64956号に述べているアポ蛋白に特異的な2種のモノクローナル抗体 (例えばPE-10等) を用いて、ヒトの血中に存在する肺疾患マーカー蛋白等免疫学的測定法の種々の条件を検討した。

本発明者らの研究によると、特願昭61-216355号に述べたごとく、免疫反応に非イオン系と陰イオン系の界面活性剤を共存させることにより、羊水中、肺胞洗浄液中気道吸引液リポ蛋白中のアポ蛋白を正しくとらえることを開示した。しかしながら、この方法を血液中の肺疾患マーカー蛋白等の測定に応用する場合、その測定系の感度および共存する血液成分による血清干渉が問題であった。

そこで本発明者らは、開示した発明をさらに発展させるべく、血液中の肺疾患マーカーを感度よ

く測定できる方法、およびキットを提供すべく鋭意研究した結果本発明に到達したものである。

即ち本発明は、ヒト肺サーファクタントアポ蛋白 (SP-A) に対する異なるエпитープを認識する2つの抗体を用いるヒト血中の肺疾患マーカー蛋白の測定法、およびその測定用キットである。

本発明においてヒトの血中に存在する肺疾患マーカー蛋白とは、血清、血漿等のヒト血中に存在し、かつ抗ヒトSP-A抗体に交叉反応性を有する1種類または2種類以上の蛋白であって、例えば間質性肺炎、肺炎、肺線癌、肺扁平上皮癌等の肺疾患時に血中に何故遊離されるのか詳細は不明であるが、これら疾患と相関関係を示すものをいう。

本発明者らによれば、この蛋白はSP-Aに対する抗体 (PE-10) を用いてアフィニティ精製した結果、分子量は20000 ~ 80000 に分布していた。

またこの蛋白は抗ヒトSP-A抗体と交叉反応性を示すことからSP-Aの分解物、複合体等も

考えられる。

本発明においては、特に反応系に①非イオン及び陰イオン界面活性剤、②分子量1.6 ~ 5.0 万でかつ等電点が1.0 ~ 5.0 である蛋白を同時に存在させることが好ましい。

かかる界面活性剤、蛋白を存在させることにより、血液中の肺疾患マーカー蛋白を特に感度よく測定することが可能になったが、その理由は、次のようなことが挙げられる。該マーカー蛋白は、羊水中や喀痰中に存在するSP-Aと同様にリン脂質と複合体を形成しているリボ蛋白と思われる。非イオン・陰イオン界面活性剤共存のみの場合、血中のリボ蛋白は可溶化は十分となり該マーカー蛋白が免疫反応に關与する抗体によって結合されることになる。しかしながら、非特異吸着をおさえることができるような蛋白成分が存在しないため、感度の低下が起り、そのため、血中で存在濃度が低い該マーカー蛋白を正しく測定できなくなる。

一方、そのような非特異吸着をおさえられる蛋

白と非イオン界面活性剤のみの存在では、血中のリボ蛋白は可溶化が不十分となり、該マーカー蛋白は、免疫反応に關与する抗体に認識されず、従って、血中の該マーカー蛋白を測定できない。しかしながら、非イオン・陰イオン界面活性剤および特定の蛋白の共存により、それぞれの長所が生かされ、即ち蛋白による非特異吸着の低下およびリボ蛋白の可溶化によりそのアポ蛋白は抗体に効率よく認識され、血中の非常に低い濃度で存在する該マーカー蛋白を測定しうることになる。

本発明に用いられる、肺サーファクタントアポ蛋白に対する異なるエпитープを認識する2つの抗体に関しては、既に特開昭61-277699号に開示されたモノクローナル抗体PC-6、PR-10等が挙げられる。また測定法に関しては、特開昭61-275654号に述べたが、異なるエпитープを認識する抗体はポリクローナル抗体でもかまわない。

本発明において反応系に同時に存在させることのできる蛋白は分子量が1.6 ~ 5.0 万で等電点が1.0 ~ 5.0 の範囲にあるものをいう。

本発明におけるかかる蛋白としては、ヘパシン、オボグリコプロテイン、オロソムコイドやカゼインやカゼインと無機質の混合物であるスキムミルク等が挙げられる。分子量1.6 万以下の蛋白を用いた場合には、非特異吸着が上昇してしまう結果を得ており、また5.0 万以上の分子量では免疫非特異的反應の低減が不十分かつ特異的免疫反應の低下が見られることにより、本発明に使用する分子量を1.6 ~ 5.0 万と決めた。

また等電点に関しても等電点5.0 以上の蛋白を添加した場合、非特異吸着が上昇し、また等電点1.0 より下では特異的反應がおさえられるために本発明に使用する蛋白の等電点の範囲を1.0 ~ 5.0 と決めた。

特に、上記蛋白の中でもスキムミルクが望ましい。

本発明においては、かかる蛋白は免疫反應溶液における最終濃度を0.01 ~ 0.9 重量%の範囲にするのが好ましい。例えばスキムミルクの緩衝液中の濃度にかかる範囲に調整すると、免疫測定法

が高濃度であるための2つの必須条件(すなわち、特異的反応を維持しながら、非特異反応を低減させる)を満たすことが容易となる。スキムミルクは、0.9%より濃い濃度では水に不溶であり、その懸濁液を用いてブロッキングするため、ミクロ的にみれば、スキムミルクの大きな不溶物が抗原を覆うため抗体が近づけなくなり、結果として、抗原抗体反応が大きく阻害されやすくなる。また0.01%以下では、十分な非特異吸着の低減効果が得られにくくなる。

また、上記蛋白と免疫反応溶液中に同時に共存させる本発明に使用する界面活性剤としては、非イオン界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル類、ポリオキシエチレンアルキルフェノールエーテル類、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル(モノ)類、ポリオキシエチレンアルキルチオエーテル類があり、また、陰イオン界面活性剤としては、高級アルコール硫酸エステル類、アルキルスルホン酸塩類、アルキルベンゼンスルホン酸塩類、ジナフチルメタンジスルホン酸

塩類、アルキルスルホコハク酸塩類、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸エステル類、ポリオキシエチレンアルキルフェノール硫酸エステル塩類などが挙げられる。

非イオン界面活性剤としては、例えば、トリトン(Rohm A Haas Co. 製の商品名)のごときポリオキシエチレンアルキルフェノールエーテル類が好ましく、陰イオン界面活性剤としては、ソジウムドデシルサルファート(SDS)のごときアルキルスルホン酸塩類が好ましい。濃度としては、前者は0.25~4重量%、後者は0.2~1重量%程度用いるのが特に好ましい。

トリトンは0.25重量%以上になると、免疫反応の保護効果があらわれ、4重量%をこえると、免疫反応を不安定にさせる傾向があらわれる。また、SDSは0.2重量%以上で界面活性効果があらわれる。SDSが3重量%をこえ、その界面活性効果があまりにも強力であり、トリトンの濃度を増しても、その免疫反応保護効果が発揮されにくくなる。

本発明においては非イオン及び陰イオン界面活性剤を併用することが好ましいが、併用する場合の重量比は陰イオン界面活性剤/非イオン界面活性剤=0.25~1.5が好ましい。

本発明においては、ヒト胎サーフラクタント蛋白に対する異なるエピトープを認識する2つの抗体を、それぞれを1次抗体、2次抗体として用いる。かかる1次抗体は担体に固定化しておくのが好ましいが、固定化の方法は公知の方法を採用でき、担体としては固相の、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリルニトリル、ポリアクリレート、テフロン等の弗素樹脂、ポリアセタール、架橋デキストリン、ポリサッカライド等の高分子、その他紙、ガラス、金属、アガロースおよびこれらの組合せ等を用いた。トレイ状、球状、繊維状、棒状、糸状、容筒状、セル、試験管などの種々の形状が挙げられ、ボール、ビーズ、ギヤ、マイクロプレート等が好ましく使用される。

また、2次抗体は標識化されていることが好ま

しいが、かかる2次抗体の標識化の方法や手段、その検出方法や手段は何ら限定されるものではなく、公知の方法や手段、例えば放射性物質または酵素もしくは蛍光物質で標識された抗免疫グロブリン抗体またはブドウ球菌蛋白Aとの2次反応により測定することもできる。標識剤としては、酵素、蛍光物質、蛍光物質および放射性物質が挙げられる。酵素を用いる方法(EIA)ではホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素が、放射性物質を用いる方法(RIA)では ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H 等が、蛍光物質を用いる方法(FIA)ではフルオレセインイソチオサイアネート、フィコビリ蛋白等、蛍光物質を用いる方法ではイソルシノール、ルシゲニン等が通常使用されるが、その標識剤の活性が測定可能であれば、その他のものであってもよい。

上記の方法の中で、2次抗体に直接酵素が標識されているものを用いることが望ましい。なぜなら、間接的な方法では免疫反応が1 step多くなり

実用的に不同きであるからである。

標識剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤が用いられる。基質としては例えば、ホースラディッシュパーオキシダーゼの基質として、2,2'-アジノジ[3-エチルベンズチアブリンスルホン酸]アンモニウム酸(ABTS)・H₂O₂、5-アミノサリチル酸・H₂O₂、O-フェニレンジアミン・H₂O₂、4-アミノアンチピリン・H₂O₂、また、ベンジジン(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等)・H₂O₂などが、β-D-ガラクトシダーゼの基質として、フルオレセイン-β-D-ガラクトピラノシド)、O-ニトロフェノール-β-D-ガラクトピラノシド、4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトピラノシドなど、アルカリフォスファターゼの基質としてO-ニトロフェニルフォスフェート等を挙げることができる。測定のためには、これらの試薬以外にも溶解剤、洗浄剤、反応停止剤等の公知の試薬が使用される。

本発明によるヒト血中に存在する肺疾患マーカー

で用いられる。これを適当な洗浄液で洗い、次いで不溶性担体上に存在する2次抗体に標識された標識物質の量を測定する。

かくしてその値から検体試料中の肺サーファクタントアポ蛋白の量を算出することができる。

本発明においては、検体試料として血清、血漿等の血液を用いる。

上記方法によって、ヒト血中の肺疾患マーカー蛋白の測定が可能になるが、上記方法によって羊水中、肺洗浄液中、喀痰中などの肺サーファクタントアポ蛋白の測定も可能であることは言うまでもない。なお、血中の該マーカー蛋白の測定にあつては、例えば血清は、2倍以上希釈することが望ましい。

測定試薬およびキットの構成

本発明のヒト血中の肺疾患マーカー蛋白の測定法に用いる測定試薬は、ヒト肺サーファクタントアポ蛋白に対する異なるエピトープを認識する2つの抗体試薬、非イオンおよび陰イオン界面活性剤と分子量1.6～5.0万でかつ等電点1.0～5.0

蛋白の免疫学的測定方法

肺サーファクタントアポ蛋白に対するモノクローナル抗体(1次抗体; PC-6)を適当な不溶性担体(例えばプラスチック容器)に固定化する(以下これを“固相抗体”という)。次いで不溶性担体と測定しようとする試薬または検体試料との非特異的結合を避けるために適当な物質(例えば牛血清アルブミン)で不溶性担体の表面を被覆する。

このようにして得られた1次抗体が固定化された不溶性担体を検体試料と、酵素で標識した抗肺サーファクタントアポ蛋白抗体(2次抗体、PE-10)(標識抗体)を、非イオン・陰イオン界面活性剤と、分子量1.6～5.0でかつ等電点が1.0～5.0なる蛋白を同時に、免疫反応液、例えば免疫反応用緩衝液に共存させ、一定時間および一定温度で接触させ反応させる。免疫反応温度は0～50℃までよいが、比較的高い温度で用いられる。ただし、低い温度の免疫反応では、反応時間は長く、比較的高い温度の免疫反応では、免疫反応時間は短い。実用面から、常温(20℃)から45℃が好ん

なる蛋白からなる。

なかでも、2つの抗体が上塗した不溶性担体に結合した固相抗体試薬と、標識抗体試薬、および上述した界面活性剤と蛋白を含有する免疫反応用緩衝液とからなる測定試薬が好ましい。

また、本発明のヒト血中の肺疾患マーカー蛋白測定用キットは、上記の測定試薬と、これら測定試薬を効率よくかつ簡単に利用するための補助剤として、例えば固体状の試薬または液状の検体を溶解させるための溶解剤、不溶性担体に非特異的に結合した抗原、抗体を洗浄するために使用される洗浄剤、および酵素で標識化した抗体を用いる場合には、酵素活性を測定するための基質およびその反応停止剤、その他の免疫学的測定用のキットとして通常使用されるものが挙げられる。

かかるキットにおいて、本発明による非イオンおよび陰イオン界面活性剤と分子量1.6～5.0万でかつ等電点1.0～5.0なる蛋白は検体を溶解させるための溶解剤に加えることが望ましい。

(b) 発明の効果

本発明により、ヒト血中などに存在する肺疾患マーカー蛋白を、極めて高感度に測定可能となり、従って少量の検体と短い時間で容易に測定できる。

以上により、肺線癌や他の肺疾患を、血中の肺疾患マーカー蛋白を測定することにより、その診断が可能となる。

(ハ) 実施例

以下、実施例により、本発明を詳述する。

実施例1 血清中の肺疾患マーカー蛋白測定条件の検討

- (1) モノクローナル抗体不溶化ビーズをよく洗浄してから、モノクローナル抗体PC-6の20 μ g / mlの濃度を有するPBS (pH7.4) 溶液中に、4℃の温度で1昼夜放置した。その後、ビーズをPBS倍液で洗浄してから、0.5 %牛血清アルブミン (BSA) 水溶液中に、4℃の温度で1昼夜放置してホストコーティング処理を実施して、モノクローナル抗体不溶化ビーズを得た。
- (2) ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体の調製

ールとを含有する0.1M酢酸緩衝液 (pH4.5) 1mlを添加し、25℃で30分間攪拌して、HRP分子中に導入したビリジルジスルフィド基を還元した。次いで、セファデックスG-25カラムにかけてゲル濾過し、チオール化HRPを含有する画分を得た。

上記の如くして得られたマレイミド化モノクローナル抗体とチオール化HRPとを混合し、コロジオンバックを用いて氷冷下に4mgの蛋白濃度まで濃縮し、4℃で1昼夜放置した後、ウルトラゲル4000を充填したカラムでゲル濾過し、HRP標識モノクローナル抗体を得た。

- (3) 血清中の該マーカー蛋白 (肺疾患マーカー蛋白) の測定

血清検体希釈緩衝液として(a) 0.6 % SDS、2.0 % トリトンX-100、0.1 % スキムミルク、(b) 0.6 % SDS、2.0 % トリトンX-100、(c) 2.0 % トリトンX-100、0.1 % スキムミルクを含む混合液3種を用い、血清検体の希釈系列を含むこの混合液とHRP標識モノクローナ

モノクローナル抗体PC-10の1.0 μ g / mlのPBS溶液に、N-(m-マレイミド安息香酸)-N-サクシンイミドエステル (MBS) の10 μ g / mlの濃度のジメチルホルムアミド溶液50mlを添加し、25℃の温度で30分間反応させた。次いで、セファデックスG-25を充填したカラムを用い、0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.0) でゲル濾過を行ない、マレイミド化モノクローナル抗体と未反応MBSとを分離した。

一方、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (HRP) の1.0 μ g / mlのPBS溶液に、N-サクシンイミジル-3-(2-ビリジルチオ) プロピオネート (SPOP) の10 μ g / mlの濃度のエタノール溶液を添加し、25℃で30分間反応させた。次いで、セファデックスG-25を充填したカラムを用い、0.01M酢酸緩衝液 (pH4.5) でゲル濾過して精製し、ビリジルジスルフィド化HRPを含有する画分を採集して、コロジオンバック中において氷冷下に約10倍に濃縮した。次に、これに0.85 % NaClと0.1 % ジチオスレイト

ル抗体PC-10希釈液とを、各々200 μ lずつ試験管中のモノクローナル抗体PC-6固定ボールに加え、免疫反応を行なった (37℃、2時間)。次に、試験管の溶液を吸引除去後、生理食塩水で洗浄してから、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン1 %含有メタノール溶液/H₂O 0.015 %を含有する1Mリン酸-クエン酸緩衝液 (pH4.5) の3/7 (V/V) 混合溶液を、各0.4 μ lずつ各試験管内に加え、室温で15分間インキュベートした後、反応停止剤として1.5 N H₂SO₄水溶液を2mlずつ加えて、酵素反応を停止させた。そして分光光度計を用いてこの溶液の450 nmの波長の吸収強度を測定した。

一方、肺癌蛋白症から精製したアブ蛋白を標準物質とし、前記と同じ混合液を希釈緩衝液とし、前記と同様にしてSDSのそれぞれの濃度に対応した検量線を作成しておいた。そして、対応するSDS濃度の検量線を用いて、前記のごとくして得られた450 nmの吸収強度から、該マーカー蛋白 (肺疾患マーカー蛋白) の濃度を

特開平4-9665 (7)

求めた。上記により得られた値により、希釈直線を得た。そのうち緩衝液 (a) を用いた結果を図1に、緩衝液 (b) を用いた結果を図2に示した。

図中×——×、○——○、●——●、△——△は各々4患者検体について測定した結果を示す。

図1から、(a) を用いた場合には、血清4倍希釈から、その希釈直線は理論希釈直線と平行し正しい値を示していることがわかる。一方、図2から (b) を用いた場合には、非特異吸着が大きくその希釈直線も、低濃度領域において理論希釈直線と平行にならず、(b) の方法は、血清系を測定するのに不適切であることがわかる。また (c) を用いた場合には、検体内の該マーカー蛋白の可溶化が不十分のため、高濃度領域から希釈直線は理論希釈直線と全く分離してしまった。以上により、本発明の (a) の場合のみが、血清中の肺疾患マーカー蛋白の測定に適することが判明し、また、血清を4〜16倍まで希釈し

ても肺疾患マーカー蛋白が高感度に測定できることがわかった。

(4) 免疫反応における血清検体希釈緩衝液中の陰イオン/非イオン界面活性剤の比の検討

血清検体希釈緩衝液として、トリトンX-100、1、2、3、4%にそれぞれSDSが1.75、1.5、1.25、1.0、0.75%含有する混合液を用いて、血清検体の希釈系列を含むこの混合液と、HxP標識モノクローナル抗体PE-10希釈とを、各々200 μ l ずつ試験管中のモノクローナル抗体PC-6固定ボールに加え、免疫反応を行った (37℃, 90分)。以下、実施例1 (3) に従って、免疫反応終了後吸光度を測定し、界面活性剤の陰イオン/非イオン比に対してプロットした。その結果を図3に示す。

図中○——○Triton X-100、1%、●——●同2%、△——△同3%、▲——▲同4%を用いた時の測定値を示す。

図3から、SDS/Triton X-100の至適重量比は、0.25〜1.5であることがわかる。

実施例2

実施例1の (a) の条件、即ち、免疫反応緩衝液に、0.6% SDS、2.0% トリトン、0.1% スキムミルクを加え、血清検体を用い免疫反応を行ない、基本性値の1つである添加回収試験のチェックを行なった。すなわち、87.3ng/ml SP-A含有血清に精製した肺疾患マーカー蛋白をそれぞれ、0、154.6、312.3、464.3ng/mlを加えて本発明の方法にて測定した結果、表1のごとく回収率は98.7〜106.4%と良好であった。

表 1

SP-A添加量 (ng/ml)	SP-A計算量 (ng/ml)	SP-A回収量 (ng/ml)	回収率 (%)
0	87.3		
154.6	242.1	217.1	89.7
312.3	399.7	425.3	106.4
464.3	557.7	555.5	100.7

実施例3 検体の測定

実施例1によって、確立した測定系を用いて、間質性肺炎 (IPF)、サルコイドーシス (Sarcoidosis)、肺炎 (Pneumonia)、肺結核 (Tbc)、およびステージ (stage) I〜IVにある肺癌 (Adrenal carcinoma)、肺扁平上皮癌 (Squamous cell carcinoma) の患者について、その血清中の肺疾患マーカー蛋白値を測定した。対照として健康人の血清中肺疾患マーカー蛋白値を測定した。結果を図3および図4に示した。

これらの結果から、明らかに間質性肺炎 (IPF)、肺炎 (Pneumonia) で高値を示し、carcinoma でやや高値を示した。一方、サルコイドーシス、肺結核 (Tbc) では陽性を示さず、本発明のヒト血中の肺疾患マーカー蛋白測定法は、上記種々の疾患の鑑別診断やそれら疾患のモニタリングに有用である可能性が示された。

4. 図面の簡単な説明

図1は、実施例1の条件 (a) にて免疫反応を行なったときの血清検体の希釈直線である。

図2は、実施例1の条件 (b) にて免疫反応を行

なったときの血清検体の希釈直線である。

図3は、実施例1の(4)で界面活性剤の重量比を変えて免疫反応を行なったときの測定値を示す。

図4は、患者検体(サルコイドーシス、間質性肺炎、肺結核、肺炎)を、本発明の免疫測定法で測定した結果を示す。

図5は、患者検体(肺線癌、肺扁平上皮癌)を、本発明の免疫測定法で測定した結果を示す。

特許出願人 密人株式会社
代理人 井理士 藤田 純 博

図 1.

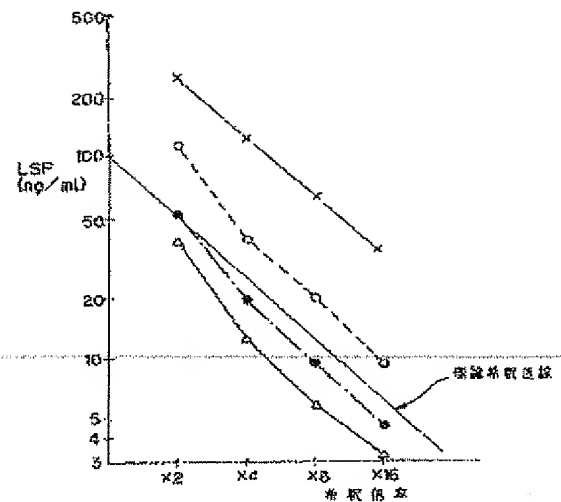


図 3

検体希釈液中の界面活性剤
(SDS/Triton x-100) 重量比

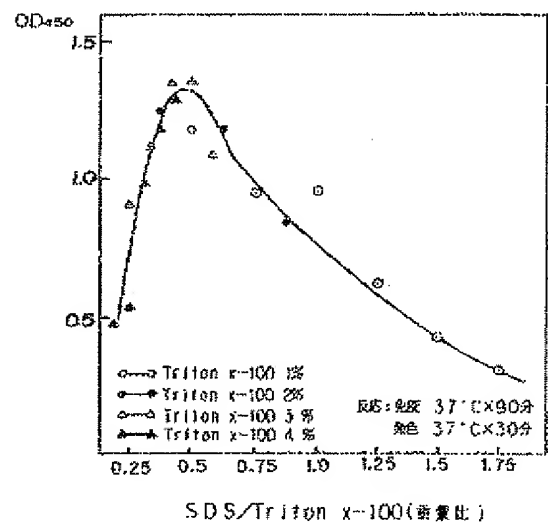


図 2

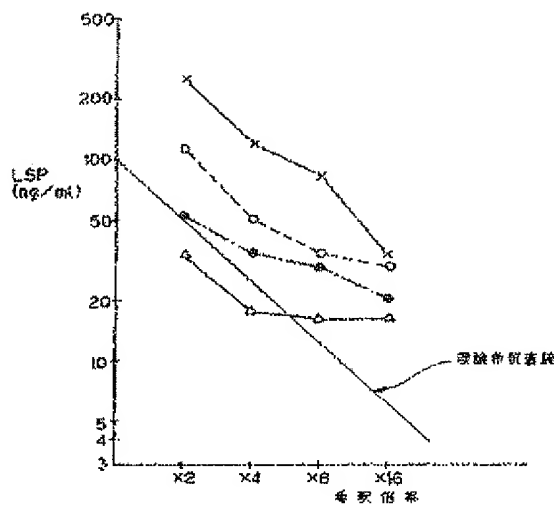


図 4

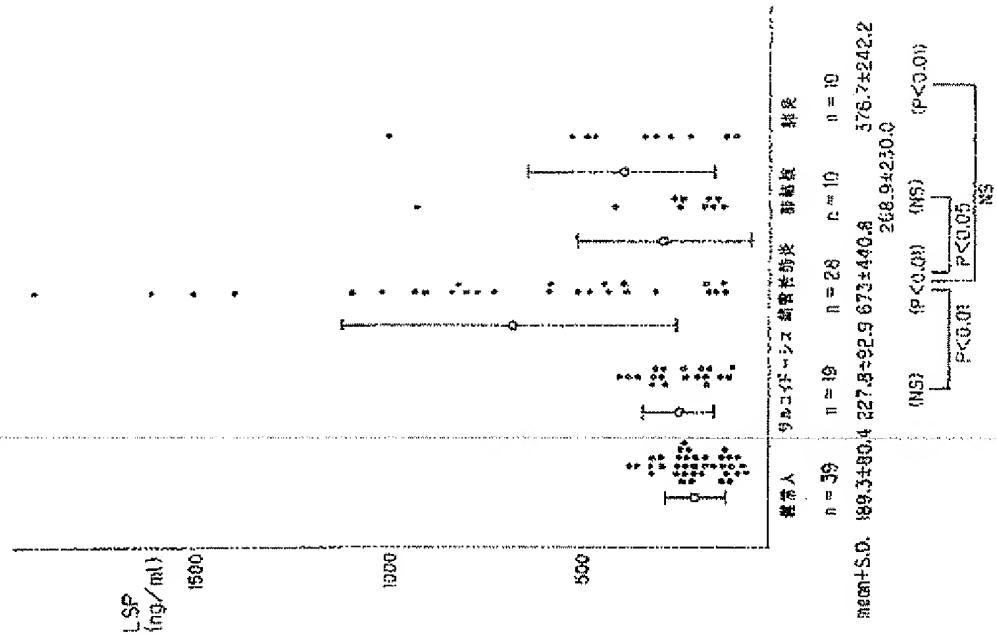
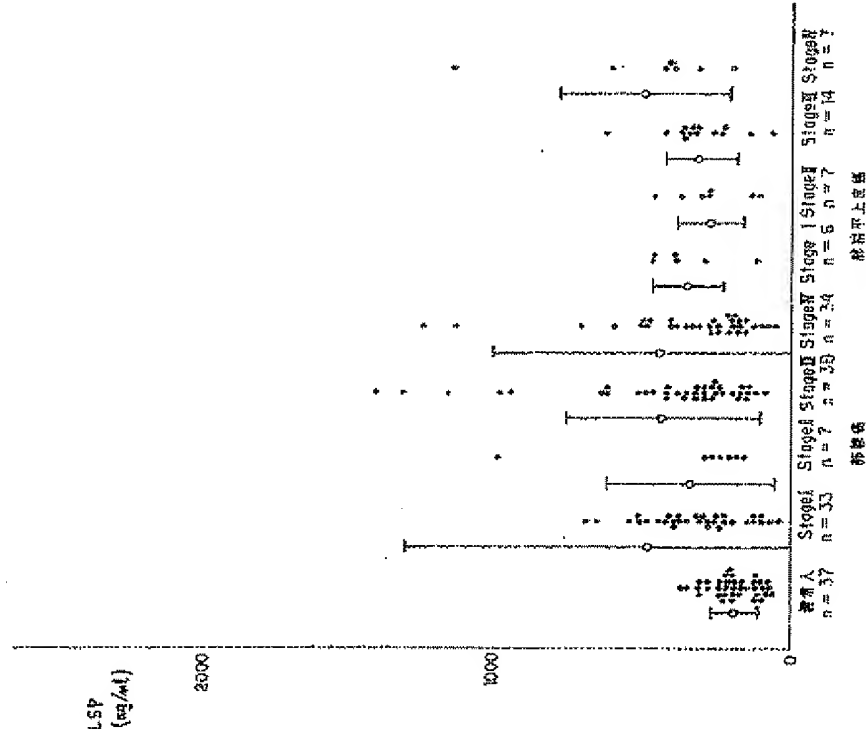


図 5



特開平4-9665 (10)

第1頁の続き

②発明者 日野 修一 郎 山口県岩国市日の出町2番1号 帝人株式会社岩国研究センター内